

Influência da concentração de metabólitos produzidos durante cultivo de *G. diazotrophicus* em meio semi-sólido na dosagem de proteínas.

Renata Jorge da Silva¹ (IC)*, Sandra Maria Andrade Fernandes², Kátia Regina dos Santos Teixeira³ (PQ). * renata_jsilva@yahoo.com.br

¹Aluna do ICE/UFRRJ, ²Graduada (Bióloga), ³Pesquisador - Embrapa Agrobiologia,.

Palavras Chave: *G. diazotrophicus*, ácido glicônico, Fe³⁺, dosagem de proteínas totais.

Introdução

A capacidade de fixar nitrogênio relacionada com o metabolismo oxidativo e produção de ácido glicônico a partir de glicose está sendo avaliada em diferentes mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo importante para a conversão do N₂ em NH₄⁺, realizado por algumas bactérias. A atividade específica da nitrogenase em cultivos de bactérias normalmente é feita a partir da associação entre as técnicas de redução de acetileno e a quantificação de proteínas totais.

A técnica de redução de acetileno se baseia no uso de cromatografia gasosa para a detecção de gas etileno produzido quando bactérias cultivadas em meio semi-sólido sem adição de fonte de N, ou em condição de FBN, são incubadas na presença de acetileno. Já a quantificação de proteínas totais é importante para o cálculo da atividade específica entre diferentes mutantes ou condições de cultivo. Para a determinação da quantidade de proteínas totais dois métodos colorimétricos foram utilizados devido a interferências relacionadas as condições de cultivo utilizadas.

Resultados e Discussão

O método de Lowry se baseia na reação do cobre com a proteína em meio alcalino, e posterior redução do reagente de Folin produzindo composto detectado com a absorvância máxima em 750nm. Este método não permitiu a quantificação de proteínas em culturas de *G. diazotrophicus* em meio semi-sólido. As culturas foram realizadas em meio LGI-P semi-sólido contendo 50 g de glicose.L⁻¹. Após incubação a 30°C durante 7 dias, estas culturas foram tratadas com 1 volume de NaOH 1N e aquecidas em banho-maria a 65°C para fusão do agar e lise alcalina das células (¹). Após este tratamento, alíquotas de 100 µL foram utilizadas para quantificação de proteínas. Concomitante com as amostras também foi realizado uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de BSA em presença do meio de cultivo e NaOH. Com base nos resultados obtidos foi observado que a presença do meio e NaOH interferiram na dosagem de proteínas em relação a curva padrão na ausência do meio contendo açúcar de caráter redutor.

O método de Bradford permitiu quantificar proteínas em culturas com 7 dias de incubação, sendo possível estabelecer a atividade específica da nitrogenase da estirpe selvagem e dos mutantes nestas condições. (Figura 1).



- pH –
solubilização
de CaCO₃
- Cor
- produção de
ácido

Aumento da atividade da nitrogenase em mutantes de *G. diazotrophicus*

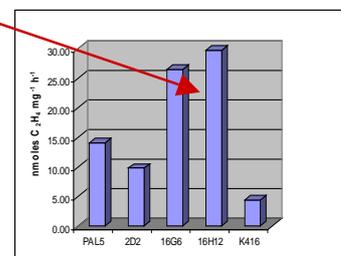


Figura 1 – Atividade específica da nitrogenase em cultivos de semi-sólidos de *G. diazotrophicus* (mutantes e selvagens) após 7 dias do início do cultivo.

No entanto, durante a realização da curva de crescimento com coletas entre o 5º e o 6º dia de incubação foi observado coloração marrom intensa após tratamento da cultura com NaOH.

Para identificar qual(ais) fatores presentes na cultura interferiram na dosagem de proteínas, diferentes concentrações de glicose ou ácido glicônico e Fe³⁺ estão sendo testados durante a preparação de curva de calibração.

Conclusões

- Metabólitos produzidos durante o crescimento de *G. diazotrophicus* interferem na dosagem de proteínas por métodos colorimétricos em cultivos semi-sólidos em presença de glicose.

Agradecimentos

CNPQ, Embrapa Agrobiologia, UFRRJ .

¹ Guedes, H.V.; Perin, L.; Reis, V.M.; Baldani, J.I. e Teixeira, K.R.S. Comunicado Técnico 95. Embrapa Agrobiologia, Junho 2007.